

influenzaの妊娠に及ぼす影響

| | |
|-----|---|
| 著者 | 武山 恒男 |
| 号 | 111 |
| 発行年 | 1961 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/17623 |

氏 名 　　たけ　　やま　　つね　　お
武　　山　　恒　　男

授 与 学 位 　　医 学 博 士

学 位 授 与 年 月 日 　　昭 和 3 6 年 3 月 2 4 日

学 位 授 与 の 根 拠 法 規 　　学 位 規 則 才 5 条 才 1 項

研 究 科 , 専 攻 の 名 称 　　東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
外 科 学 系

学 位 論 文 題 目 　　*influenza* の 妊 娠 に 及 ぼ
す 影 響

指 導 教 官 　　東 北 大 学 教 授 　　九 嶋 勝 司

論 文 審 査 委 員 　　東 北 大 学 教 授 　　九 嶋 勝 司

東 北 大 学 教 授 　　石 田 名 香 雄

東 北 大 学 教 授 　　荒 川 雅 男

論文内容要旨

第 I 章 緒 言

1941年 Gregg が風疹と先天性奇形の相関々係を指摘して以来、従来単に遺伝性或は梅毒に帰せられていた先天性奇形の原因として、非遺伝的因子の重要性が大きくとりあげられる様になった。

母体が virus 感染症に罹患した場合、virus はその粒子の大きさから考えて簡単に胎盤を通過し、代謝分化の盛んな胎芽の原基或は発生途上の幼若細胞に寄生増殖し、その結果発生異常、ひいては流産・奇形を生ずるという可能性は充分考えられる。風疹をはじめとし、その後種々の virus 性疾患によつても奇形の起ることが、相次いで報告されて来た。その中には influenza によるとみられる奇形の臨床報告や動物実験報告も含まれているが、実際に奇形が起るとすれば 1957年に流行した Asian influenza の如く大多数の人間が非免疫集団であつた場合、決してゆるがせに出来ない問題と思われる。

著者はこの点を追及する為にマウスと influenza A virus (PR8) の組合せで、オ一に果して virus が従来考えられている様に簡単に胎盤を通過して胎仔に移行するものかどうかを、 ^{32}P 標識 virus を使用することによつて確認し、オ二に移行した virus は胎仔ではどの臓器に分布し、奇形・流産を発生せしめるだけの増殖と組織の侵襲を来すものかどうかを、virus 増殖と感染組織の螢光顕微鏡観察及び病理組織学的検索の両面から追及し、オ三にいわゆる critical period と云われる妊娠早期に罹患した場合の、妊娠経過と胎仔に及ぼす影響について観察した。

第 II 章 実験材料並びに実験方法

i) マウス：教室飼育の dd 系を使用した。

ii) virus：influenza A virus (PR8), その EID_{50} は $10^{6.5}/\text{ml}$, 赤血球凝集素価 (HA) は $10^{3.7}/\text{ml}$ である。virus の稀釈はすべて broth で行つた。

iii) ^{32}P 標識 virus の精製：Liu, Hoyle 等によつて明らかにされている如く、予め ^{32}P を投与してある発育孵化鶏卵の中で virus が増殖する場合、 ^{32}P は phospholipid P, 核酸 P として virus 構成成分の中に入ることにより labeled virus が得られる。これに従つて標識 virus を精製したがその純度は 94% 前後で free ^{32}P の contamination は極めて少い。

iv) virus 感染方法： ^{32}P 標識 virus は尾静脈内に接種した。その他の実験には最も自然感染に近い経鼻噴霧感染法 (inhalation) を用いた。その方法は約 2 l の容積の円柱形の chamber に Voponephrin 型の nebulizer を連結し、chamber の内部を 2 段に区切り 1 回に 10 匹を 1 群としてマウスを入れ、nebulizer 中の virus 液を 10 分間に 1 ml 噴霧する様 compressor で圧力を調節し (その圧力は普通 300 mmHg) 30 分噴霧する。今回はすべて 3 ml を噴霧した。

v) virus 量の測定：④ EID_{50} ：被検臓器を先ず乳鉢で磨碎、broth を加えて 10% 乳剤を作り 2,500 rpm 速心、その上清を broth で 10 倍段階稀釈し各稀釈液の 0.2 ml を 11 日発育鶏卵 3 コの漿尿腔内に接種、 37°C 48 時間培養、その漿尿液の鶏赤血球凝集素産生の有無を以て Reed Muench にならい算定した。⑤ HA 価：上記の材料に等量の RDE を加え、その 0.5 ml を pH 7.2 の 2.5% クエン酸ソーダ加生理食塩水で倍数稀釈し、同じく 2.5% クエン酸ソーダ加生

理食塩水に浮遊した0.5%鶏赤血球を加え混和後40°Cに2時間静置、Salkのpattern法で判定した。尚、 ED_{50} ・HA価とも各臓器重量あたりの絶対量に換算して記載した。

vi) 蛍光抗体法: Coons等によつて試みられた方法で、抗原に対する結合力を損わない様に抗体に蛍光物質を結合させ、これを用いて組織切片上で抗原抗体反応を行わせ、蛍光顕微鏡下で観察する。抗原が存在すればその発する蛍光によつて肉眼的に確認出来る。被検材料にはvirus増殖を測定した標本の一部を用いた。先ずdry ice, acetoneで-70°C附近に冷却されている液体プロパンガス中で凍結せしめ、cryostat (室温-18°C~-20°C)で4~6μの凍結切片を作つた。染色にはいわゆるsandwich methodを用いた。即ち才一次血清として抗PR8家兎血清をかけ、次いでfluoresceine isothiocyanateをlabelしてある抗家兎γ-globulin山羊血清を作用せしめた。蛍光顕微鏡はBG12 filterを使用して観察した。

vii) 病理組織学的検索: 70% alcohol固定、Hematoxylin-Eosin染色を施して観察した。

第三章 実験成績並びに考按

I virusの胎盤通過に関して

周知の如くvirusは細菌と異なり自分自身は代謝機能を持たず、専ら宿主細胞に寄生し、寄生細胞の代謝によつてのみ増殖していくものであるが、その寄生性であることと共にvirusは極めて小さい粒子であるという点で、胎盤通過機序は細菌と違つていると考えられる。即ち一般に細菌は絨毛組織が侵襲或は破壊された場合の他は胎盤を通過しないと云われているが、virusは正常胎盤をも容易に通過すると信じられていることである。

virusが胎仔に移行するには種々のルートが考えられるが、最も多く且つ妥当と考えられるのは胎盤の血行を介してであろう。それには先ず母体にviremiaの状態の起る必要がある。著者は ^{32}P 標識virusを精製し、countの測定可能なだけ一時的に高いviremiaの状態を作ることにより胎盤通過の様相を知ろうとした。そこで妊娠7~9日目のマウスの尾静脈内に0.5mlで2,500 cpmのradioactivityをもつvirusを注射し、接種後1・3・及び5時間目の母体の肺・肝・子宮・卵巣及び胎盤・胎仔をとり出し、濃硝酸を用い小Kjeldahlフラスコ中で湿性灰化した後にGeiger Müller計数装置で放射能を測定し、count数によつて各臓器全量中の感染後各時間毎のvirus分布量を求めた。その結果、肝に圧倒的に多くみられたのは静脈内投与の結果当然と云えようが、その他の臓器では接種1時間後に肺に接種量の0.6%が証明され、同じ時間に既に胎仔にも0.5%即ち殆んど同じ位の量が証明された。3時間後には肺には殆んど増減がなれて拘らず、胎仔の方では1.9%と約4倍に増加して来ており、5時間後には肺ではおぼえて半減しているのに胎仔では更に増加して来ているのが認められた。従つてこの成績の範囲内ではvirusは胎盤に行きつくと同時に容易に母仔間の隔壁を通過し、短時間内に胎仔に移行するものと解釈することが出来る。

II) 胎盤・胎仔に於けるvirus増殖について

胎仔諸臓器に於いてvirus増殖を証明すれば、当然virusが胎盤を通過することの積極的証明となろうし、又その際幼若な組織・臓器が成熟動物とは異つた増殖の態度を示すとすれば、流産或は奇形発生を支持する有力な手掛りとなる。

著者は妊娠15日前後のマウスを選び、 $10^{7.6}ED_{50}$ のvirusをinhalationせしめ、感染後1~6日目迄24時間毎にト殺しvirus増殖を追及した。即ち、親2匹を1群とし仔は2匹分すべてpoolし、親肺・胎盤・仔肺・仔脳・仔肝・仔内臓に分けて ED_{50} ・HA価を測定した。 ED_{50} 測定の結果では、親の肺に於ける増殖が最も著しく、3日目に最高値を示した。胎盤・胎仔諸臓

器ではそれよりもずっと order は低いがやはり各々増殖が認められ、中でも肺と脳に親肺と同じく3日目にピークを持つカーブが得られ、Woolpert らのモルモット胎仔に於ける実験とは全く違った結果を示した。HA 価測定の結果では、測定出来たのは親の肺のみで胎盤・胎仔諸臓器では測定不能であつた。ト殺を待たず早産したマウスはそのまゝ観察を続けると、5日目から6日目にかけて半数が死亡し、7日目には100%死亡した。

蛍光抗体法による検索は、抗原抗体反応を利用する点極めて応用範囲が広いが、非特異反応の除去や組織内の抗原検出にはその切片の作成方法等に吟味すべき点も多い。今回の実験にあつては対照として非感染マウスの各臓器を感染マウスと同じく処理したものしか行わなかつたが、対照標本の蛍光は一樣に淡く、局所的に強く光る感染標本とは明らかに区別された。その所見は親肺では hilus 附近の気管支・小気管支壁に著明の蛍光がみられ、内腔に浸潤した細胞群も蛍光を発していた。これに反して consolidation を起している部分は光り方が弱く、血管壁には殆んど蛍光を認めなかつた。これらの所見は5~6日目の標本に最も強く、Liu の記載しているフェレットの PR8 感染症の所見と全く同一であつた。仔肺は4~5日目の変化が最強で、hilus 附近の血管壁に蛍光が著明であつた。仔脳には virus 増殖が認められたにも拘らず蛍光の局在部位を証明出来なかつた。これについては接種後の経過時間や切片の截断方向等に検討を要する点があると思われる。胎盤は parietal yolk sack epithel 並びに Reichert's membrane がきれいに染められており、血管は母体側も胎仔側も同じ位に強い蛍光を発していた。しかし迷路層には病理組織標本で変化が強いにも拘らず蛍光は認め得なかつた。

病理組織学的検索では、親肺は既に幾多の報告によつて明らかにされたように胞隔性肺炎に一部気管支肺炎を混じた像を示した。仔肺は間質に円形細胞の浸潤が強く、親肺にみられる気管支壁の変化は軽度で、この変化は感染5日目のものが最高であつた。仔脳では殊に終脳に神経細胞の変性壊死・出血・細胞浸潤等が存在し、神経節細胞群の脱落や gliosis 等が認められ、或は脳室上衣下層の細胞の変性・壊死や、更に脳室上衣の glia の異常増生による癒着を思わせる様な所見が認められた。これらの所見から考えると神経節細胞は再生能力を欠くものであるから、病変の局在部位と程度により生後種々の機能的或は器質的障害、例えば白痴とか脳水腫等の異常を生ずる可能性は充分に推定され、奇形発生の問題と関連して興味ある点と思われる。現に今回の実験でも脳奇形の1例が認められた。又内臓にも virus 増殖が証明されたのは、臨床的に influenza による奇形として幽門狭窄を多くみている Kaye 等の報告を支持するものであろう。胎盤に於ける virus 増殖は仔肺・仔脳に比して軽度の様にみられたが病理組織標本でみる限りでは侵襲が最も強く、特に迷路層では充血・出血が甚しく随所に壊死が認められ、流産発生の有力な原因たりうと思われる。

一方、妊婦が influenza に罹患した場合、非妊婦より予後の不良なことが1919年の大流行に際し報告されている。その原因の一つとして virus の侵襲の強いことも考えられるが、今回の実験によると妊婦マウスの肺に於ける増殖は、従来報告されている非妊成熟マウスのそれを凌駕していることが判明した。

III) 妊娠早期罹患の妊娠経過・胎仔に及ぼす影響について

virus が細胞に寄生増殖するにあつて、代謝機能の盛んな幼若細胞が対象として好条件なのはいうまでもなく、従つてこれら侵襲された細胞は分裂分化の過程がゆがめられ、将来の奇形発生の素地になることは想像に難くない。風疹による奇形には trias として、先天性白内障・心臓障害があげられているが、殆んど全部これらの器管原基が完成する妊娠3ヵ月以内の罹患に限

られており、この事実からこの時期は一般に critical period と呼ばれている。

著者は交配3日目のマウスに sublethal dosis ($10^{6.3}$ EID₅₀/3ml) を inhalation せしめてその影響を追及した。オーに分娩した仔を観察した場合には、virus 感染群は対照群に比して、奇形仔は見出し得なかつたが死産仔が遙かに多く、且つ仔も小さいことがわかつた。又死産仔を含めての1腹当りの平均胎仔数は、対照の7.6に比し感染群では7.0と少かつた。そのまゝ哺乳観察を続けて10日後の生存仔数の分娩仔数に対する割合を求めてみると、対照が80.4%であるのに感染群では64.2%と低率を示した。これら死亡した仔の肺を pool して virus 増殖を追つたが検出は出来なかつた。オ二に胎仔の運命をより詳細に調べる為に感染10日目にト殺観察を行つたところ、感染群では死胎・吸収胎数が対照の約4倍と高率を示し、先の分娩時に観察した場合に感染群で仔数の少なかつたのはこの様な胎内で死亡し吸収されるものが相当数ある為であることが判明した。又この際 pseudoencephaly と称すべき明らかな脳奇形が1例認められた。胎内に於けるこれらの胎仔死亡乃至は吸収胎の存在については Howell, Adams, 大庭等も観察しているが、その原因が virus による胎盤障害に基くものか或は胎仔に於ける増殖とその侵襲の結果によるものかどうかは明確にされていない。著者はこの一連の実験から、感染直後の virus 分布が胎盤と胎仔とで殆んど同時であり、又その後の侵襲が双方で行われていることから、胎仔障害の原因には両者が同程度に関係しているものであると考える。

最後にこれ迄得られた data は、あくまで lethal dosis 乃至は sublethal dosis という臨床的には考えられない大量感染の条件のもとで行われており、そのまゝ臨床にあてはめるわけにはいかない。その上更に不顕性感染とそれに伴う免疫の問題を結びつけるとき、解決への道はまだ遠いといわなければなるまい。influenza 流行後の臨床観察も散見されるが、風疹による奇形が現今の批判的な報告にあつても尚20%~30%と高率なのに比べ、有意差をみつけることは困難である。

第IV章 結 論

1) ³²P 標識 virus を妊娠7~9日目のマウス尾静脈内に接種し、胎盤・胎仔に於ける放射能の count を経時的に測定した結果、virus は胎盤に行きつくと同時に胎仔に移行し、胎盤に於ける増殖を必ずしも必要とするものではないことを知つた。

2) 次に胎仔に移行した virus がどの臓器に分布し、且つ奇形乃至は流産を発生せしめるだけの増殖と組織の侵襲を来すものかどうかについて検討した。virus 増殖は胎盤・胎仔諸臓器に認められ、特に胎仔の肺と脳に著明であつた。同時に蛍光抗体法による組織観察と病理組織学的検索を行い、virus 増殖と組織侵襲を支持する結果を得た。

3) いわゆる critical period と呼ばれる妊娠早期に罹患した場合の妊娠経過と胎仔に及ぼす影響をみるため妊娠3日目に sublethal dosis を感染せしめた。感染群では生まれてくる仔数が少く且つ小さいことを知り、その原因には子宮内での死亡吸収胎が対照より遙かに多いことをト殺実験により確認した。又この際奇形例を認めた。

4) 以上の実験成績をそのまゝ臨床にあてはめることは勿論困難であるが、奇形或は流産発生の可能性は大きく、influenza 流行に際しては臨床家の注意が望まれる。

審 査 結 果 要 旨

Greggが風疹に罹患した妊婦から多数の奇形児が生れたことから、奇形とウイルスとの関係が重視されるに至ったが、この方面の実験的な裏付けが充分になされている訳ではない。

筆者は、妊婦が最も罹り易いウイルス疾患としてはインフルエンザの右に出るものがない点に着目し、インフルエンザが胎児に及ぼす影響について検討を加え、次の成績を得た。

1) ^{32}P 標識ウイルスを妊マウスに静注して観察するに、ウイルスは胎盤を通過して胎仔に到達し繁殖することを確認した。

2) 妊マウスに注入されたウイルスが何のような部位で増殖するかを、 EID_{50} 、HA、更に蛍光抗体法などで観察すると、胎盤や胎仔の肺や脳で特に増殖することを確認した。

3) 妊娠早期に感染した場合に、胎仔にどのような影響を及ぼすかを見るために、妊マウスで交尾後3日目にウイルスに感染させたところ、感染群では対照群よりも仔の数は少く、且つ小さいことが分つた。仔数の少ないのは胎仔が死亡し子宮内で吸収されることが多いためであつた。吸収されないものには奇形が認められるものも確認された。

以上から、筆者はインフルエンザに感染した母体から奇形児が生れ、或は高度奇形の結果、胎児死亡や流産も起り得ることを確認している。本論文は先天異常の防止に有力の手がかりを与えた点で有意義なものである。